

明細書

ステイプル型オリゴヌクレオチドおよびそれからなる医薬

技術分野

本発明は、新規なステイプル型オリゴヌクレオチド、およびそれを有効成分とする医薬に関する。

従来技術

従来オリゴヌクレオチドは、転写因子阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA などとして広く利用されてきた。

これらの中でも、例えば転写因子阻害剤として具体的には、遺伝子発現を調整する転写因子の活性を特異的に阻害する分子おとり(デコイオリゴヌクレオチド、以下デコイ)型核酸を挙げることができる。

ここで転写とは、生体内の遺伝情報が発現する際、DNA を鋳型にしてメッセンジャーRNA を合成する過程を指し、転写によって作られたメッセンジャーRNA の情報をもとにタンパク質が合成される。この転写を調整する因子を転写調節因子と呼んでいる。

具体的には、NF- κ B、STAT-1、STAT-2、STAT-3、STAT-4、STAT-5、STAT-6、GATA-3、AP-1、E2F、Ets、CRE など 54 種類が知られている。

アンチセンスとして具体的には、目的の遺伝子と対合する配列を持ち、その遺伝子の発現を抑止する医薬を挙げることができる。

siRNA として具体的には、RNA 干渉(RNA interference ; RNAi)によって、標的遺伝子の発現阻害する医薬を挙げることができる。

またこれらのオリゴヌクレオチドは、構造上、二本鎖を構成していることが特徴である。

本発明の背景となる先行文献は、Biochem Biophys Res Commun. 2003 Sep 5;308(4):689-97、Gene Ther. 2002 Dec;9(24):1682-92 および Circ Res.

2002 Jun 28;90(12):1325-32 である。

発明の開示

本発明において解決しようとする問題点は、従来型のオリゴヌクレオチドは両端が開放(open)になっているために不安定であること、またホスホロチオエート化(S化)修飾によりエキソヌクレアーゼ(exonuclease)等の分解酵素に対する安定性を高めることも行われているが、ホスホロチオエートに起因する毒性が生じることである。

本発明は、具体的には下記の物質および医薬である。

- (1) 一本鎖オリゴヌクレオチドであって、5'端配列が中間部配列に逆向きの相補性を有し、3'端配列も中間部配列に逆向きの相補性を有し、中間部の両端に分子内で相補的な結合を形成しない3~10の塩基配列からなるループ部を有するステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (2) 一本鎖オリゴヌクレオチドが30~70塩基長である、(1)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (3) 一本鎖オリゴヌクレオチドが34~64塩基長である、(1)ないし(2)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (4) 一本鎖オリゴヌクレオチドが38~58塩基長である、(1)ないし(3)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (5) 一本鎖オリゴヌクレオチドが42~54塩基長である、(1)ないし(4)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (6) ループ部が、4~6塩基長である(1)ないし(5)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (7) 一本鎖オリゴヌクレオチドが42~54塩基長であり、ループ部が4~6塩基長である、(1)ないし(6)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (8) オリゴヌクレオチドがDNAまたはDNA誘導体である、(1)ないし(7)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (9) リン酸基がホスホロチオエート化されていないことを特徴とする、(1)な

いし(8)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

(10) 配列表の配列番号1ないし3で表されるオリゴデオキシヌクレオチドから選ばれた1種である、(1)ないし(9)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

(11) (1)ないし(10)記載のステイプル型オリゴヌクレオチドからなる医薬。

(12) 医薬が転写因子阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは siRNA である(11)記載の医薬。

(13) 転写因子阻害剤が拮抗的阻害剤である、(12)記載の医薬。

(14) 転写因子が、NF- κ B、STAT-1、STAT-2、STAT-3、STAT-4、STAT-5、STAT-6、GATA-3、AP-1、E2F、Ets および CRE から選ばれた1種である、(12)または(13)記載の医薬。

(15) 医薬が、炎症、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、中枢性疾患、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化または経皮的冠動脈形成術(percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA)後の再狭窄の予防・治療・改善剤である、(12)ないし(14)記載の医薬。

(16) 炎症が、関節炎、皮膚炎、腎炎、肝炎、腎不全、膀胱炎、前立腺炎、尿道炎、潰瘍性大腸炎またはクローニング病である、(12)ないし(15)記載の医薬。

(17) 関節炎が、慢性関節リウマチまたは変形性関節症である、(16)記載の医薬。

(18) 皮膚炎が、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚潰瘍または褥瘡である、(16)記載の医薬。

(19) (1)ないし(10)のいずれかに記載したステイプル型オリゴヌクレオチドを転写因子阻害剤、アンチセンスまたは siRNA の製造のために用いる用途。

(20) (1)ないし(10)のいずれかに記載したステイプル型オリゴヌクレオチドの薬理学上有効量を患者に投与することにより、転写因子阻害剤、アンチセンスまたは siRNA が有効な疾患を予防・治療・改善する方法。

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドは一本鎖であって、5'端配列が中間部配列に逆向きの相補性を有し、3'端配列も中間部配列に逆向きの相補性を有し、中間部の両端に分子内で相補的な結合を形成しない3～10の塩基

配列からなるループ部を有するステイプル型構造(押圧後のホッチキス針の形状)を有しており、具体的には例えば、下記化学式のような構造を有する。

SEQ. 1	A	A		
	A	GGAGGGAAATCCCTTCAAGG	A	
	A	CCTCCCTTTA	GGGAAGTTCC	A
	A		A	
SEQ. 2	C	A		
	C	CAGGAGGGAAATCCCTTCAAGG	A	
	T	GGTCCTCCCTTTA	GGGAAGTTCC	A
	A		A	
SEQ. 3	T	T		
	T	AAAGGGAAATCCCTTCAAGA	T	
	T	TTTCCCTTTA	GGGAAGTTCT	T
	T		T	

式中、縦線は非結合部[5' 端および3' 端]を意味する。

またその鎖長は限定されないが、通常は30~70 塩基長であり、好ましくは34~64 塩基長であり、より好ましくは38~58 塩基長であり、さらに好ましくは42~54 塩基長である。

次にループ部は3~10 塩基長であり、好ましくは4~6 塩基長である。

さらに5' 端および3' 端の折り返し部配列(5' 端または3' 端からループ部までの相補性を有する配列)の鎖長も限定されないが、通常は4~20 塩基長であり、好ましくは6~18 塩基長であり、より好ましくは8~16 塩基長である。

なお5' 端および3' 端の折り返し部配列の鎖長は、同一(対称形)であっても異なって(非対称形)いてもよい。

さらに本発明におけるオリゴヌクレオチドは限定されず、DNA、DNA誘導体、RNAあるいはRNA誘導体であってもよいが、DNAまたはDNA誘導体がより好ましい。

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドの具体例としては、例えば配列表の配列番号1ないし3で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを挙げることができる。

なお本発明にかかるステイプル型オリゴヌクレオチドは、常法に従い、DNA合成機などで目的とする一本鎖配列を合成した後、溶媒中で加温することによって得ることができる。

また本発明におけるホスホロチオエートとは、リン酸基中の酸素原子が一部または全部、硫黄原子で置換された構造を意味する。

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドの医薬用途は限定されないが、具体的には、例えば転写因子阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA 等であり、より具体的には、例えば炎症、自己免疫疾患、中枢性疾患、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化、PTCA 後の再狭窄等の予防・治療・改善剤である。

ここで炎症としてさらに具体的には、例えば関節炎、皮膚炎、腎炎、肝炎、腎不全、膀胱炎、前立腺炎、尿道炎、潰瘍性大腸炎、クローン病等を挙げる二とができる。

次に関節炎としてさらに具体的には、例えば慢性関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)等を挙げることができる。

続いて皮膚炎としてさらに具体的には、例えばアトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚潰瘍、褥瘡等を挙げることができる。

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドの投与量あるいは投与経路も、疾患の種類・程度、症状、患者の年齢、性別、合併症、併用薬等によって異なり限定されないが、通常1回あたり $10\text{ }\mu\text{g} \sim 10\text{ g}$ を、好ましくは $100\text{ }\mu\text{g} \sim 5\text{ g}$ を、より好ましくは $1\text{ mg} \sim 1\text{ g}$ を、経皮、皮下、関節内、筋肉内、静脈内または経口投与する。

なお本発明とは別に、例えば W003/091432 号公報等に開示された環状デコイ(リボン型デコイ)もあるが、本発明にかかるステイプル型は開環部を有しており、構造的に全く異なる。

本発明の実施により、従来型オリゴヌクレオチドが有する不安定性が改善され、投与量低減が可能となり、また安全性も向上させることができる。

図面の簡単な説明

図1は、LPS 刺激 24 時間後の、培養上清中の IL-1 β 量を示した図である。

図2は、LPS 刺激 24 時間後の、滑膜上清中の IL-1 β 量を示した図である。

図3は、ステイプル型デコイの安定性を示した電気泳動図である。

実施例

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がこれらに限定されることは言うまでもない。

実施例 1

ステイプル型オリゴヌクレオチドの抗炎症効果の検討

A. サイトカインの定量

1. 滑膜組織の処理

(1) 手術時に採取した関節リウマチ患者の滑膜組織をホモジナイズ (homogenize) した後、100mg ずつ 24well plate に播いた。 (無血清培地 [serum free medium] 500 μ l/well)

NF- κ B デコイ、Scramble デコイ のトランスフェクション (transfection) (HVJ envelope 法)

(2) HVJ 1.1×10^4 HAU/1.1 ml BSS [Balanced Salt Solution (137mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH7.6)] の状態で 99mJ/cm² で UV 処理した。

(3) 1ml ずつ 1.5ml チューブに分注し、4°C, 15000rpm, 15min 遠心処理した。

(4) 200 μ g のデコイに BSS を添加し 92 μ l とした。

(5) 3% TritonX-100/TE Buffer 溶液 8 μ l を添加した。

(6) 4°C, 15000rpm, 15min 遠心後上清除去した。

(7) BSS 1ml を加えて混合後 15000rpm, 15min 遠心分離した。

(8) 上清除去後 200 μ l の PBS に懸濁した。

(9) 15 μ M になるようにデコイ-HVJ envelope 混合体を滑膜組織に加えて 37°C の CO₂ インキュベーターで 30 分インキュベートした。

加えたデコイの配列

二重鎖 NF- κ B デコイ

5' -CCTTGAAGGGATTCCTCC-3' / 5' -GGAGGGAAATCCCTCAAGG-3' (二本鎖)

Scramble デコイ

5' -CATGTCGTCACTGCGCTCAT-3' / 5' -ATGAGCGCAGTGACGACATG-3' (二本鎖)

ステイプル型オリゴヌクレオチド(i)

5' -ATTTCCTCCAAAAGGAGGGAAATCCCTCAAGGAAAACCTTGAAGGG-3' (1ヶ所で
ligation)

リボン型オリゴヌクレオチド(ii)

5' -ATTTCCTCCAAAAGGAGGGAAATCCCTCAAGGAAAACCTTGAAGGG-3' (2ヶ所で
ligation)

2. LPS 刺激

(10) デコイ-HVJ envelope 混合体を除去し 10%FBS 入り培養液(medium) 500 μ l を加えて 0.01 μ g/ml となるように LPS を添加した。

3. 培養液、滑膜組織回収、IL-1 β 測定

(11) 24 時間後に培養液及び滑膜組織を回収。滑膜組織に PBS 500 μ l を加えて ホモジナイザー(homogenizer) でホモジナイズ(homogenize) した。

5000rpm, 10min 遠心後上清を採取した。IL-1 β 測定まで-20°Cで保存した。

(12) 培養上清、滑膜上清を IL-1 β ELISA キット (ENDOGEN 社、カタログ No. : EH21L1B) で測定した。

4. 結果

培養上清中の IL-1 β 量 (pg/ml) (図 1 参照)

NT (LPS0)	90.8	NT (LPS0.01)	303.9
SC (LPS0)	49.6	SC (LPS0.01)	370.7
NF (LPS0)	102.1	NF (LPS0.01)	312.6
R1 (LPS0)	14.6	R1 (LPS0.01)	25.1
R2 (LPS0)	22.9	R2 (LPS0.01)	74.3

滑膜上清中の IL-1 β 量 (pg/ml) (図 2 参照)

NT (LPS0)	17.5	NT (LPS0.01)	170.9
SC (LPS0)	7.2	SC (LPS0.01)	145.7
NF (LPS0)	10.5	NF (LPS0.01)	484.8
R1 (LPS0)	13.5	R1 (LPS0.01)	38.9
R2 (LPS0)	15.6	R2 (LPS0.01)	111.2

NT : 未処置群

SC : scramble デコイ投与群

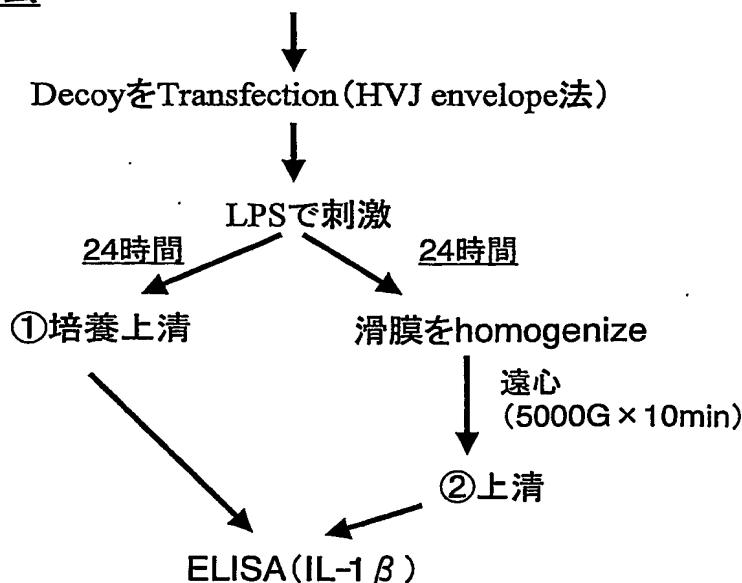
NF : NF κ B デコイ投与群

R1 : ステイプル型オリゴヌクレオチド (ligation1 か所)

R2 : リボン型オリゴヌクレオチド (ligation2 か所)

ステイプル型オリゴヌクレオチド作用群において培養上清、滑膜上清中の IL-1 β の産出を抑えていた。1ヶ所ライゲーション(ligation)したステイプル型オリゴヌクレオチドの方が抑制効果は強かった。(二重鎖 NF κ B 作用群で今回の実験では抑制効果が弱かった。)

上記サイトカイン定量の全体の流れを下記に示す。

方法 RA患者の培養滑膜組織

実施例 2

B. リボン型デコイの安定性試験(図 3 参照)

目的：関節液(原液)中のデコイの耐性比較

配列、実験条件：

- 1) S 化二重鎖デコイ
- 2) S 化ステイプル型デコイ
- 3) 非 S 化ステイプル型デコイ (S 化なし)
- 4) 一本鎖デコイ (ステイプル型オリゴヌクレオチドの ligation する前の段階)
- 5) 断端 S 化一本鎖デコイ (ステイプル型オリゴヌクレオチドの ligation する前の段階、両断端のみ S 化したもの)

それぞれに関節液(原液)を 0%, 50% または 100% 加え、安定性を電気泳動にて比較した。

結果：関節液中で 1) S 化二重鎖デコイ、2) S 化ステイプル型デコイと 5) 断端 S 化一本鎖デコイは安定、3) 非 S 化ステイプル型デコイはほぼ安定、4) 一本鎖デコイは分解されていた。

詳しくは、1) S 化二重鎖デコイ、2) S 化ステイプル型デコイは、共に 100% 関節液中においても 0% (無添加) と同様に安定であった。

また 3) 非 S 化ステイプル型デコイでは、関節液濃度依存的にデコイの安定性は減少したものの、100% 関節液中においても、十分に検出可能な安定なデコイが存在した。

一方、4) 断端 S 化一本鎖デコイと 5) 一本鎖デコイは、1)～3) と比較して関節液中での安定性は低かった。

しかし 4) 断端 S 化一本鎖デコイと 5) 一本鎖デコイを比較すると、4) 断端 S 化一本鎖デコイでは 100% 関節液中においても、安定なデコイがわずかに認められたが、5) 一本鎖デコイでは 50% 関節液中でも安定なデコイは認められなかつた。

請求の範囲

1. 一本鎖オリゴヌクレオチドであって、5' 端配列が中間部配列に逆向きの相補性を有し、3' 端配列も中間部配列に逆向きの相補性を有し、中間部の両端に分子内で相補的な結合を形成しない 3~10 の塩基配列からなるループ部を有するステイプル型オリゴヌクレオチド。
2. 一本鎖オリゴヌクレオチドが 30~70 塩基長である、請求項 1 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
3. 一本鎖オリゴヌクレオチドが 34~64 塩基長である、請求項 1 または 2 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
4. 一本鎖オリゴヌクレオチドが 38~58 塩基長である、請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
5. 一本鎖オリゴヌクレオチドが 42~54 塩基長である、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
6. ループ部が、4~6 塩基長である請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
7. 一本鎖オリゴヌクレオチドが 42~54 塩基長であり、ループ部が 4~6 塩基長である、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
8. オリゴヌクレオチドが DNA または DNA 誘導体である、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
9. リン酸基がホスホロチオエート化されていないことを特徴とする、請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
10. 配列表の配列番号 1 ないし 3、または下記構造式で表されるオリゴデオキシヌクレオチドから選ばれた 1 種である、請求項 1 ないし 9 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

SEQ. 1 A A A
 A GGAGGGAAATCCCTTCAAGG A
 A CCTCCCTTTA | GGGAAAGTTCC A
 A
 :
 C A
SEQ. 2 C A
 T CAGGAGGGAAATCCCTTCAAGG A
 GGTCCCTCCCTTA | GGGAAAGTTCC A
 A
 A A
 T T
SEQ. 3 T T T
 T AAAGGGAAATCCCTTCAAGA T
 T TTTCCCTTTA | GGGAAAGTTCT T
 T T

式中、縦線は非結合部[5'端および3'端]を意味する。

1 1. 請求項 1 ないし 1 0 のいずれかに記載のステイプル型オリゴヌクレオチドからなる医薬。

1 2. 医薬が転写因子阻害剤、アンチセンスまたは siRNA である請求項 1 1 に記載の医薬。

1 3. 転写因子阻害剤が拮抗的阻害剤である、請求項 1 2 記載の医薬。

1 4. 転写因子が、NF- κ B、STAT-1、STAT-2、STAT-3、STAT-4、STAT-5、STAT-6、GATA-3、AP-1、E2F、Ets および CRE から選ばれた 1 種である、請求項 1 2 または 1 3 記載の医薬。

1 5. 医薬が、炎症、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、中枢性疾患、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化または経皮的冠動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA) 後の再狭窄の予防・治療・改善剤である、請求項 1 2 ないし 1 4 のいずれかに記載の医薬。

1 6. 炎症が、関節炎、皮膚炎、腎炎、肝炎、腎不全、膀胱炎、前立腺炎、尿道炎、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、請求項 1 2 ないし 1 5 のいずれかに記載の医薬。

1 7. 関節炎が、慢性関節リウマチまたは変形性関節症である、請求項 1 6

記載の医薬。

18. 皮膚炎が、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚潰瘍または褥瘡である、請求項16記載の医薬。

19. 請求項1ないし10のいずれかに記載したステイプル型オリゴヌクレオチドを転写因子阻害剤、アンチセンスまたは siRNA の製造のために用いる用途。

20. 請求項1ないし10のいずれかに記載したステイプル型オリゴヌクレオチドの薬理学上有効量を患者に投与することにより、転写因子阻害剤、アンチセンスまたは siRNA が有効な疾患を予防・治療・改善する方法。

図 1

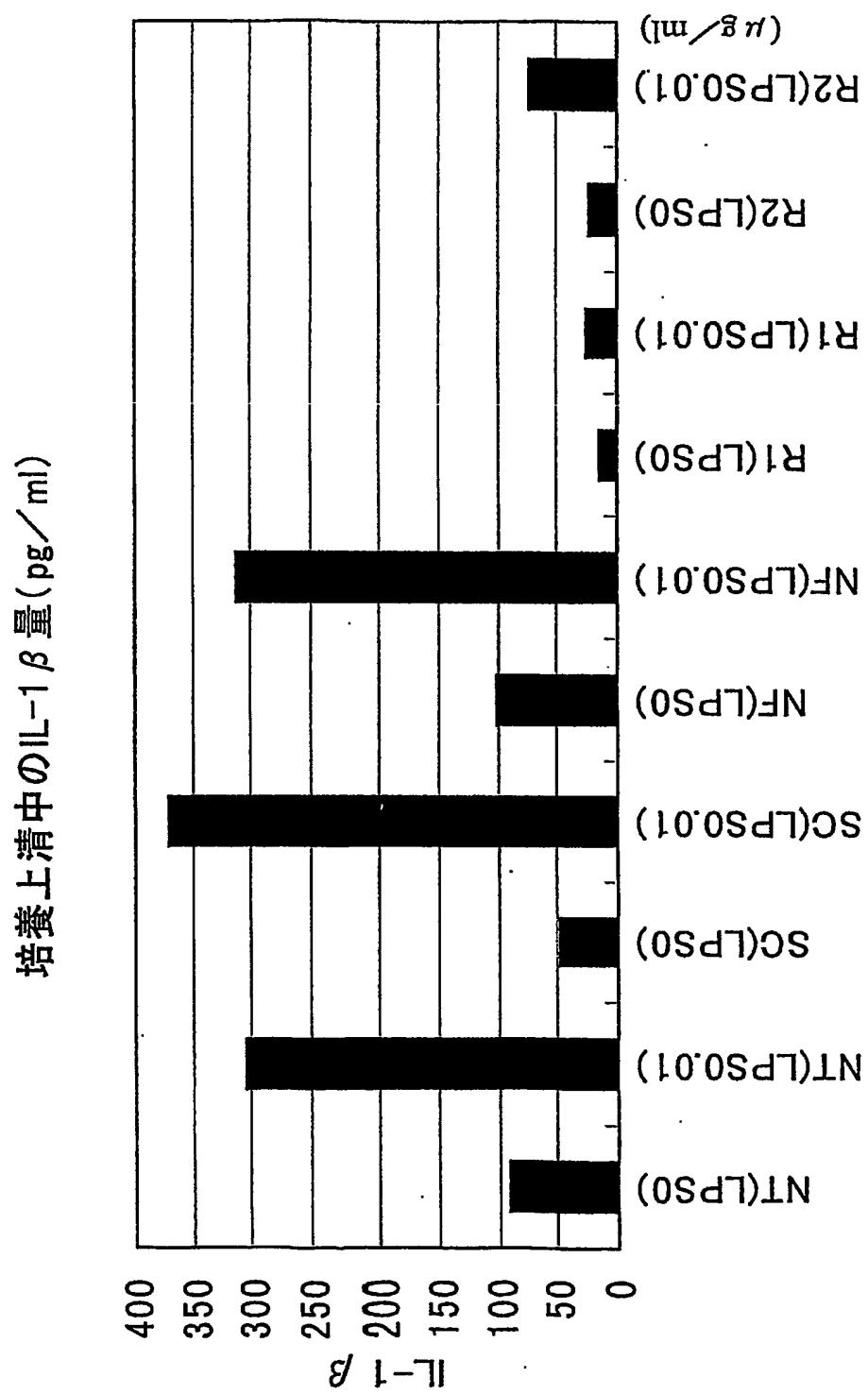


図 2

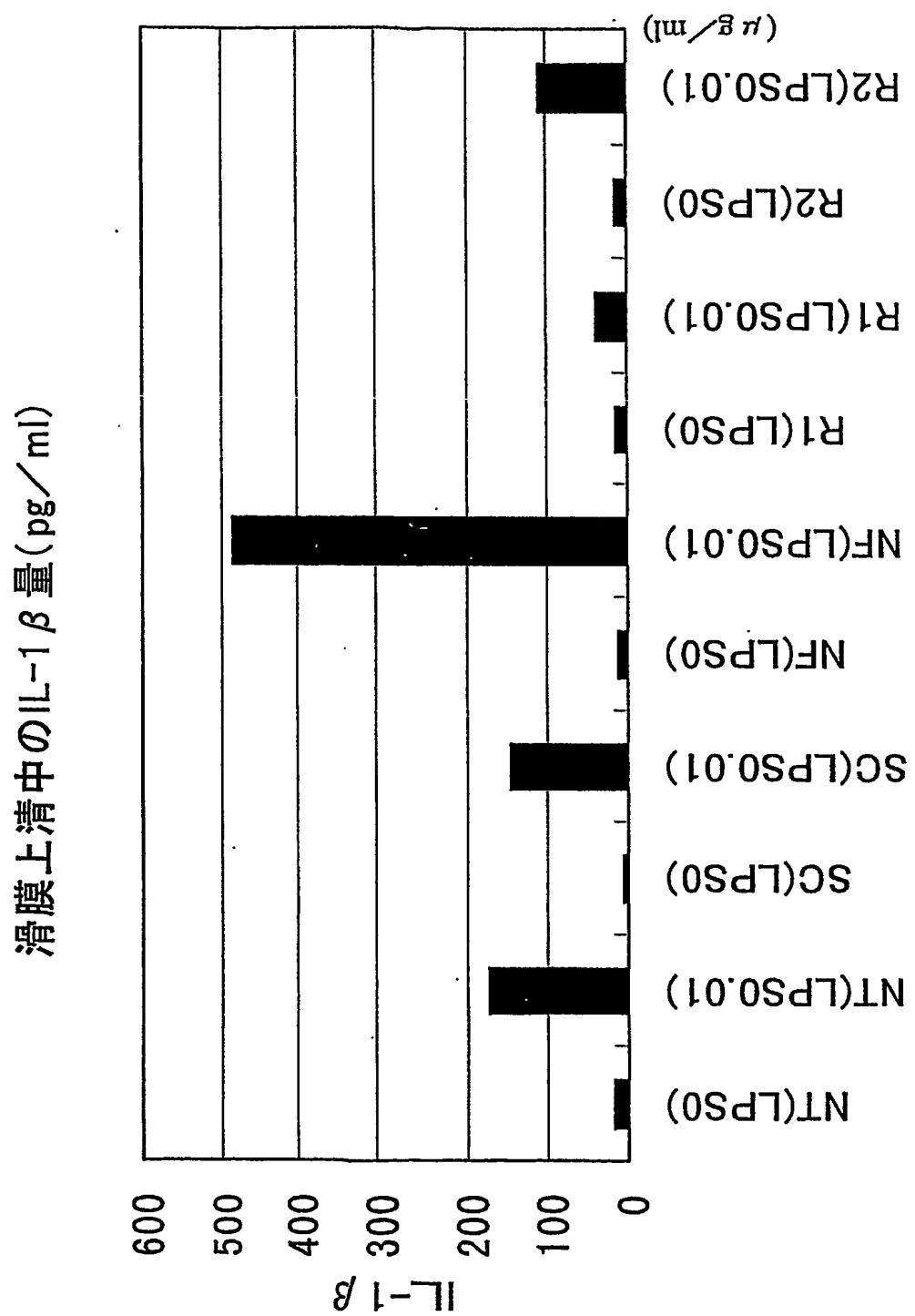
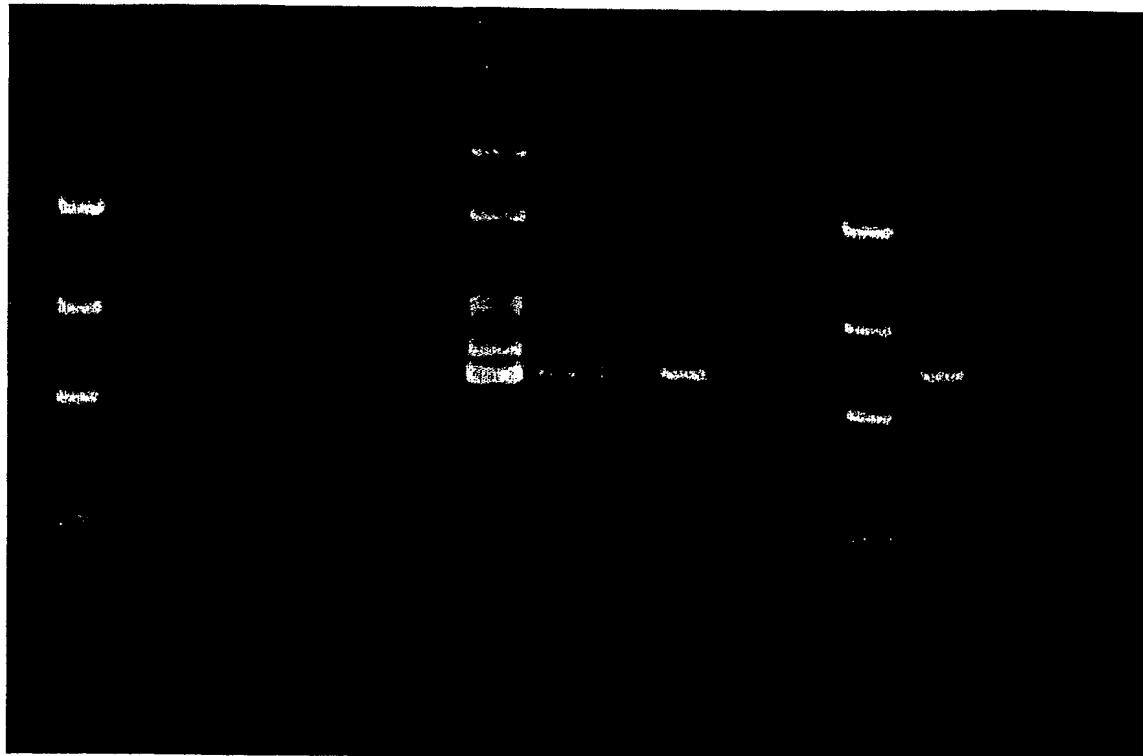


図 3

ステイプル型デコイの耐性実験(関節液原液)



関節液 0 50 100% 0 50 100% 0 50 100% 0 50 100% 0 50 100%
分子量マーカー 1)S化二重鎖 2)S化ステイプル型 3)非S化ステイプル型 4)一本鎖 断端S化 5)一本鎖
A B C D E F G H I M N O J K L
分子量マーカー

SEQUENCE LISTING

<110> AnGes MG, Inc.
<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 3
<200> SEQUENCE CHARACTERISTICS:
<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 48
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA
<400> SEQUENCE: 1
ATTCCTCC AAAAGGAGGG AAATCCCTTC AAGGAAAACC TTGAAGGG
20 40
<200> SEQUENCE CHARACTERISTICS:
<210> SEQ ID NO 2
<211> LENGTH: 53
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA
<400> SEQUENCE: 2
ATTCCTCC TGGATCCCAG GAGGGAAATC CCTTCAAGGA AACCTTGAA GGG
20 40
<200> SEQUENCE CHARACTERISTICS:
<210> SEQ ID NO 3
<211> LENGTH: 48
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA
<400> SEQUENCE: 3
ATTCCTTT TTTAAAGGG AAATCCCTTC AAGATTTTC TTGAAGGG
20 40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/11, A61K48/00, A61K31/713, A61P37/00, A61P17/00, A61P9/00, A61P13/10, A61P13/12, A61P13/08, A61P13/02, A61P1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/00-15/90, A61K48/00, A61K31/713, A61P37/00, A61P17/00, A61P9/00, A61P13/10, A61P13/12, A61P13/08, A61P13/02, A61P1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/23026 A1 (GENSET), 13 October, 1994 (13.10.94),	1-9, 11, 12, 15-19
Y	& FR 2703053 A1	13, 14
A	Page 7, lines 15 to 22; page 9, drawing: Figs. 2, 4	10
Y	SHIBUYA, T. et al., A double-strand decoy DNA oligomer for NF- κ B inhibits TNF α -induced ICAM-1 expression in sinusoidal endothelial cells. Biochem.Biophys.Res.Commun., 2002, Vol.298, pages 10 to 16	12-14
Y	NOVINA C.D. et al., siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. Nat.Med. 2002, Vol.8, No.7, pages 681 to 686	12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 October, 2004 (26.10.04)

Date of mailing of the international search report
16 November, 2004 (16.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/014694

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94/12633 A1 (STIEFEL LABORATORIES Inc.), 09 June, 1994 (09.06.94), & GB 2273932 A	1, 8, 9, 11, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014694

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 20 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) (continued to extra sheet.)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2004/014694
--

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)
of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/11, A61K48/00, A61K31/713, A61P37/00, A61P17/00, A61P9/00, A61P13/10, A61P13/12, A61P13/08, A61P13/02, A61P1/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00-15/90, A61K48/00, A61K31/713, A61P37/00, A61P17/00, A61P9/00, A61P13/10, A61P13/12, A61P13/08, A61P13/02, A61P1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), BIOSIS(STN), WPIDS(STN)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	WO 94/23026 A1 (GENSET) 1994.10.13 & FR 2703053 A1 第7頁第15-22行目、第9頁の図、FIG. 2、4など参照	1-9, 11, 12, 15-19 13, 14 10
Y	SHIBUYA T. et al., A double-strand decoy DNA oligomer for NF- κ B inhibits TNF α -induced ICAM-1 expression in sinusoidal endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, Vol. 298, p. 10-16	12-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」日頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
26. 10. 2004

国際調査報告の発送日

16.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
佐久 敬

4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	NOVINA C. D. et al., siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. Nat. Med. 2002, Vol. 8, No. 7, p. 681-686	12
A	WO 94/12633 A1 (STIEFEL LABORATORIES Inc.) 1994. 06. 09 & GB 2273932 A	1, 8, 9, 11, 12

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲20に記載された発明は、ヒトの身体の治療による処置方法又は診断方法に係るものであるから、PCT17条(2)(a)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.